

三相中空纤维液相微萃取在羟基苯甲酸类化合物分析中的应用

朱颖, 陈璇, 郑飞浪, 白小红*

(山西医科大学药学院, 山西太原 030001)

摘要 :在优化的三相中空纤维液相微萃取(3p-HFLPME)条件下,研究了6种羟基苯甲酸类化合物(HBAs)的3p-HFLPME行为,揭示了HBAs的富集因子(EF)与其正庚醇/水条件分配系数($\log P_{n\text{-heptanol}/5\text{ mmol/L HCl}}$), pK_a 和羟基数目(N)的相关性,初步阐明了聚偏氟乙烯中空纤维对HBAs的电荷转移传递机理以及有机溶剂对HBAs的选择性萃取机理。优化的3p-HFLPME条件:以MOF 503聚偏氟乙烯中空纤维为有机溶剂支持体,正庚醇为有机相,5 mmol/L HCl体系为给体,80 mmol/L $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 为接受相,搅拌速度为1 200 r/min,萃取35 min。该方法的精密度(以相对标准偏差计)小于3%,检出限为0.09 ~ 30.00 $\mu\text{g/L}$,加标回收率为93.3% ~ 107.1%,HBAs质量浓度为5 mg/L时的富集因子最高达107.6倍。

关键词 :三相中空纤维液相微萃取;羟基苯甲酸;富集因子;聚偏氟乙烯中空纤维;电荷转移化合物

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)06-0769-07 栏目类别 :研究论文

Application of three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction for analysis of hydroxybenzoic acids

ZHU Ying, CHEN Xuan, ZHENG Feilang, BAI Xiaohong*

(School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract : Under the optimal experimental conditions of three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction (3p-HFLPME), the behaviors of hydroxybenzoic acids (HBAs) were investigated. The correlativities between the enrichment factor (EF) of HBAs and their n -heptanol/water conditional distribution coefficients ($\log P_{n\text{-heptanol}/5\text{ mmol/L HCl}}$), pK_a and the number of -OH (N); the extraction mechanism that polyvinylidene difluoride hollow fiber contributed to promote the extraction efficiency by forming charge transfer compound with HBAs and the organic solvents showed notable selectivity for HBAs were elucidated. The optimal 3p-HFLPME conditions were: MOF 503 polyvinylidene difluoride hollow fiber as organic solvent supporter, n -heptanol as organic phase, 5 mmol/L HCl in the donor phase and 80 mmol/L $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ as the acceptor phase, the HBAs were extracted for 35 min under an agitation of 1 200 r/min. It was found that the relative standard deviations were lower than 3%, the detection limits were 0.09 - 30.00 $\mu\text{g/L}$, the average recoveries of HBAs in *Calyx Kaki* were 93.3% - 107.1% and the EF of HBAs at 5 mg/L was up to 107.6 fold.

Key words : three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction; hydroxybenzoic acids; enrichment factor; polyvinylidene difluoride hollow fiber; charge transfer compound

中空纤维液相微萃取(hollow fiber liquid-phase microextraction, HFLPME)于1999年由Pedersen-Bjergaard和Rasmussen提出^[1]。该技术富集因子高、样品净化能力强、有机溶剂用量极少、环境友好。目前,HFLPME所用中空纤维主要为聚丙烯、聚砜^[2]和聚偏氟乙烯^[3-7],中空纤维孔径和壁厚被认为是影响分析物萃取效率的主要因素^[2,3]。但在本课题组前期研究中发现,聚偏氟乙

烯作为有机溶剂支持体其萃取效率明显高于同时研究的其他中空纤维。我们认为中空纤维在液相微萃取过程中不仅能起有机溶剂支持体和微孔过滤的作用,而且还参与了对被分析物的萃取,对提高化合物萃取效率有贡献^[3-6],并据此提出了聚偏氟乙烯中空纤维与苯丙酸类化合物之间的电荷转移超分子作用机理^[6]。HFLPME中使用的有机溶剂主要有正辛醇、甲苯、二己基醚等^[7],有机溶剂的萃取机理方

* 通讯联系人:白小红,教授,研究方向为复杂样品的提取、分离与富集。E-mail:bxh246@163.com.

基金项目:山西省自然科学基金项目(No. 2007011086)和太原市大学生创新创业基金项目(No. 08122034)。

收稿日期:2009-03-12

面的报道主要有 π - π 偶极相互作用^[8]、质子传递和疏水相互作用^[9]。中空纤维结构以及有机溶剂种类对羟基苯甲酸类化合物(HBAs)液相微萃取效率的影响机制至今尚无报道。

HBAs 属酚酸类药物,在中药中分布较为广泛,由于苯环上羟基位置和数目的不同,这类化合物的药效性质有较大的差别。其中,3,4,5-三羟基苯甲酸能诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长^[10];而3,5-二羟基苯甲酸是合成咳嗽素类药物的重要原料。目前文献报道对中药样品中 HBAs 的提取方法主要有超声法^[11]、回流法^[12]和索氏提取法^[13]等。

本文选取 6 种 HBAs 3,4,5-三羟基苯甲酸(3,4,5-THBA)、3,5-二羟基苯甲酸(3,5-DHBA)、3,4-二羟基苯甲酸(3,4-DHBA)、4-羟基苯甲酸(4-HBA)、2,5-二羟基苯甲酸(2,5-DHBA)和 2,4-二羟基苯甲酸(2,4-DHBA),研究其三相 HFLPME(3p-HFLPME)行为,阐述了聚偏氟乙烯中空纤维在 HBAs 萃取中的电荷转移传递机理和有机溶剂的氢键机理,揭示了 HBAs 的富集因子(EF)与其正庚醇/水条件分配系数($\log P_{n\text{-heptanol}/5\text{ mmol/L HCl}}$)、羟基数目(N)和 pK_a 之间的相关性,并将优化的 3p-HFLPME 与高效液相色谱(HPLC)两种分析技术相结合测定了柿蒂中微量 3,4,5-THBA、3,4-DHBA、4-HBA 和 2,5-DHBA 的含量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Shimadzu LC-10A 高效液相色谱仪。聚偏氟乙烯中空纤维(MOF 503,内径/外径:(0.5/0.8) mm,孔径:0.2 μm);MIF 503,内径/外径:(0.8/1.4) mm,孔径 0.1 μm);聚醚砜(UEIS 910,内径/外径(0.8/1.3) mm,孔径 0.2 μm)和聚砜(UPIS 503,内径/外径(0.8/1.2) mm,孔径 0.2 μm)均购自天津膜天膜工程技术有限公司,聚丙烯(PP,内径/外径(0.6/1.0) mm,孔径 0.2 μm)由天津大学海水淡化与膜技术中心提供。

3,4,5-THBA、3,4-DHBA、2,4-DHBA、4-HBA、3,5-DHBA 和 2,5-DHBA 对照品均购自天津市光复精细化工研究所,色谱纯乙腈购自天津市大茂化学试剂厂,其余有机溶剂均为分析纯。柿蒂药材产地为河南省,经鉴定为柿树科植物柿果实的宿萼。

1.2 色谱条件

Kromasil C18 柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μm ,Dikma Technologies 公司),柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$,检测波长为 246 nm,流动相为乙腈-0.15% 磷酸(体积比为 12:88),流速为 1 mL/min,进样量为 20 μL 。

1.3 标准溶液的配制

精密称取 3,4,5-THBA、3,5-DHBA、3,4-DHBA、4-HBA、2,5-DHBA 和 2,4-DHBA 对照品各 100 mg,分别置于 100 mL 容量瓶中,用双蒸水溶解并稀释至刻度,得质量浓度为 1 g/L 的储备液。

1.4 三相中空纤维液相微萃取

准确吸取样品溶液和 HCl 适量置于一个洗净的双黄连口服液瓶(容积约 11 mL)中作为给体,使给体体积为 10 mL,给体中 HBAs 质量浓度为 5 mg/L、HCl 浓度为 5 mmol/L,将两根 12 cm 长的中空纤维用甲醇超声洗净吹干后浸入正庚醇 10 s,待其孔隙充满正庚醇后取出,吹出纤维中多余的正庚醇,用注射器在纤维中注入 80 mmol/L 的 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液作为接受相,将纤维弯曲为 U 形浸入样品溶液中,在 1200 r/min 速率搅拌下萃取 35 min,萃取结束后,用 HPLC 进样针吸出萃取液,供分析。

2 实验结果

2.1 液相微萃取条件的优化

2.1.1 中空纤维种类对萃取效率的影响

考察了 5 种中空纤维(UPIS 503、PP、MIF 503、MOF 503 和 UEIS 910)作为有机溶剂支持体的萃取效率(见图 1),发现以聚偏氟乙烯(MOF 503 和 MIF 503)中空纤维作为萃取溶剂支持体时 HBAs 的 EF 明显高于其他中空纤维,表明中空纤维的化学结构是影响 3p-HFLPME 萃取效率的重要因素。聚偏氟乙烯中的 F 原子电负性强,可作为电子给体,HBAs 苯环上有吸电子的 $-\text{COOH}$ 和 $-\text{OH}$,使苯环上的电子云密度降低而缺电子,可作为电子受体,二者形成电荷转移化合物,使 HBAs 在中空纤维外侧表面聚集,HBAs 又与有机溶剂(如正庚醇)形成氢键而被萃取到有机溶剂中;在中空纤维内侧,与有机溶剂形成氢键的 HBAs 遇碱离子化而被萃取到接

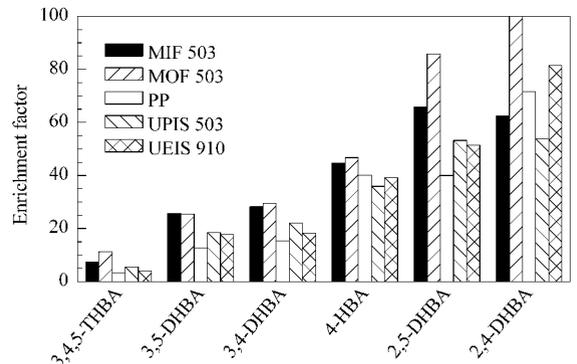


图 1 中空纤维种类对 HBAs 萃取效率的影响

Fig. 1 Influence of hollow fiber type on extraction efficiency of HBAs

$C_{d,i}$ = 5 mg/L, $C_{d,i}$ is the initial concentration of HBAs in the donor phase.

受相中(见图 2)。可见,聚偏氟乙烯中的 F 原子与 HBAs 的电荷转移反应在萃取过程中对 HBAs 起到了传递作用,从而提高了萃取效率。

此外,同为聚偏氟乙烯结构,MOF 503 中空纤维作为有机溶剂支持体萃取效率高于 MIF 503 中空

纤维,这是由于 MOF 503 的孔径大于 MIF 503,纤维壁也较 MIF 503 薄,使其传质阻抗减小,HBAs 更易通过 MOF 503 中空纤维进入到接受相中。这一结论与文献[2,3,7]中报道的一致。因此,本实验选择 MOF 503 中空纤维作为有机溶剂的支持体。

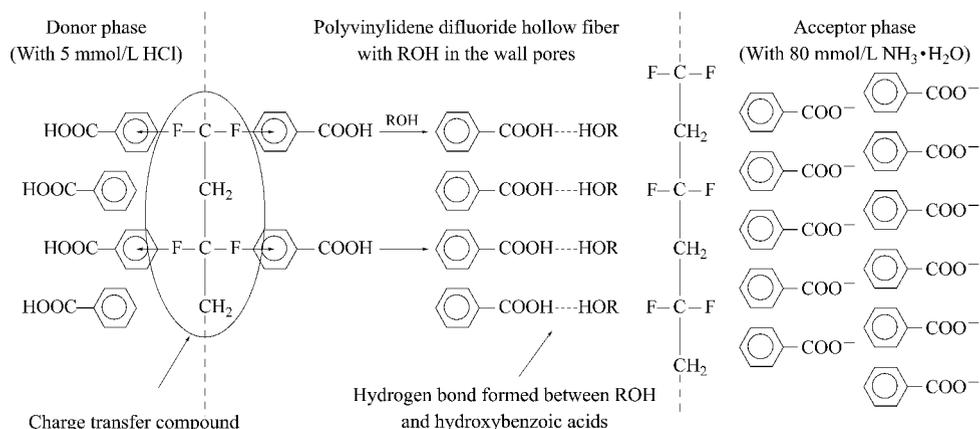


图 2 聚偏氟乙烯与 HBAs 的电荷转移反应对该类化合物的传递作用

Fig. 2 Transfer contribution of charge transfer reaction between polyvinylidene difluoride and HBAs
HBAs are simply presented with benzoic acid in this diagram.

2.1.2 有机溶剂种类对萃取效率的影响

考察了正构醇、烷烃、氯代甲烷、苯及其衍生物、腈和酮作为有机相的萃取效率,结果见表 1。

由表 1 可知,多数正构醇作为有机相时 HBAs 的 EF 明显高于其他溶剂,原因在于正构醇中的 -OH 能与 HBAs 的 -COOH 和 -OH 形成氢键,增

表 1 以不同有机溶剂为有机相时 HBAs 的富集因子¹⁾

Table 1 Enrichment factors of HBAs with different organic solvents as the organic phase¹⁾

| Organic solvent | Enrichment factors | | | | | |
|----------------------|--------------------|----------|----------|-------|----------|----------|
| | 3,4,5-THBA | 3,5-DHBA | 3,4-DHBA | 4-HBA | 2,5-DHBA | 2,4-DHBA |
| <i>n</i> -Butanol | 3.4 | 5.6 | 6.8 | 20.8 | 9.8 | 9.2 |
| <i>n</i> -Pentanol | 3.5 | 5.7 | 7.3 | 19.0 | 11.2 | 9.9 |
| <i>n</i> -Hexanol | 7.3 | 12.5 | 13.1 | 27.3 | 40.8 | 41.7 |
| <i>n</i> -Heptanol | 13.9 | 26.0 | 27.1 | 48.8 | 88.8 | 91.3 |
| <i>n</i> -Octanol | 4.4 | 18.7 | 17.4 | 44.5 | 44.5 | 61.8 |
| <i>n</i> -Nonanol | 1.1 | 12.5 | 13.3 | 40.0 | 27.2 | 50.9 |
| <i>n</i> -Decanol | 0.9 | 11.8 | 13.0 | 36.0 | 17.8 | 45.6 |
| Acetonitrile | 4.7 | 5.4 | 7.2 | 21.0 | 9.3 | 8.7 |
| Ethyl cyanide | 4.8 | 5.5 | 7.8 | 22.8 | 10.0 | 8.9 |
| Butyronitrile | 5.7 | 6.2 | 8.9 | 24.3 | 11.5 | 11 |
| Acetone | 4 | 4.7 | 6.9 | 18.8 | 9.2 | 8.7 |
| Butanone | 4.5 | 5.5 | 7.9 | 21.5 | 9.8 | 9.0 |
| Dichloromethane | ud ²⁾ | 0.08 | 0.03 | 0.01 | 0.02 | 0.02 |
| Trichloromethane | 0.2 | 0.2 | 0.06 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Tetrachloromethane | 0.1 | 0.1 | 0.06 | 0.07 | 0.05 | 0.1 |
| Pentane | 0.06 | 0.07 | 0.05 | 0.04 | 0.1 | 0.1 |
| Hexane | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.05 | 0.1 | 0.2 |
| Heptane | 0.1 | 0.06 | 0.03 | 0.05 | 0.09 | 0.1 |
| Octane | ud | 0.07 | 0.03 | 0.06 | 0.06 | 0.1 |
| Isooctane | ud | 0.07 | 0.03 | 0.06 | 0.06 | 0.1 |
| Cyclohexane | 0.01 | 0.07 | 0.04 | 0.05 | 0.08 | 0.1 |
| Benzene | 0.3 | 0.4 | 0.4 | 0.6 | 0.4 | 0.4 |
| Toluene | 0.04 | 0.9 | 0.05 | 0.3 | 1.9 | 1.4 |
| Chlorobenzene | 0.03 | 0.06 | 0.04 | 0.2 | 0.05 | 0.07 |
| Orthodichlorobenzene | 0.03 | 0.05 | 0.02 | 0.05 | 0.03 | 0.07 |

1) $C_{d,i} = 5 \text{ mg/L}$. 2) ud: under the detection limit.

加 HBAs 在其中的溶解度使它们易从给体转移到有机相中而提高萃取效率,HBAs 的 EF 开始时随正构醇分子中 C 原子数增加而增加,正庚醇对 6 种组分的萃取效率最高,之后 EF 随正构醇 C 原子数增加而降低,表明正构醇中正庚醇与 HBAs 形成氢键能力最强;腈类和酮类溶剂由于 C≡N 基团中的 N 原子与 C=O 基团中的 O 原子可以作为质子受体与 HBAs 分子形成氢键,对 HBAs 也有较好的萃取作用,但 N 原子和 O 原子的质子接受能力较 -OH 差,因此它们作为有机相时 HBAs 的 EF 低于正构醇;苯及其衍生物中仅甲苯对某些 HBAs 有一定的萃取作用,其他的萃取效率极低,这可能是由于甲苯与 HBAs 苯环间的 π-π 偶极相互作用提高了 HBAs 在甲苯中的溶解度;烷烃及氯代甲烷类溶剂对 HBAs 几乎没有萃取作用,表明它们与 HBAs 分子间的作用力极弱。总之,由于 HBAs 中 -COOH 和 -OH 的存在,氢键成为决定它们在 3p-HFLPME 过程中萃取效率的主要因素,与它们形成氢键能力越强的有

机溶剂萃取效率越高,反之越低。本实验选择正庚醇作为有机相。

2.1.3 接受相对萃取效率的影响

HBAs 因含 -COOH 和 -OH 而显酸性,以适量的碱作为接受相可使 HBAs 以离子状态存在,增加其在接受相中的溶解度而提高萃取效率。本实验考察了 0.5 ~ 20 mmol/L 的 NaOH 和 0.5 ~ 90 mmol/L 的 NH₃·H₂O 作为接受相时的萃取效率,发现 HBAs 的 EF 随 NaOH 与 NH₃·H₂O 浓度的增加而增加,分别在 NaOH 的浓度为 10 mmol/L 和 NH₃·H₂O 的浓度为 80 mmol/L 时达到峰值(见表 2)。此外,比较两种接受相下 HBAs 的 EF 发现,两种接受相的浓度相同时,NH₃·H₂O 作接受相时 HBAs 的 EF 高于 NaOH,其原因可能是 NH₃·H₂O 含有电负性较大的 N 原子,可与 HBAs 中的 -COOH 和 -OH 形成氢键,使得 HBAs 更易从有机相中进入接受相,从而提高萃取效率。因此本实验选择 80 mmol/L 的 NH₃·H₂O 作为接受相。

表 2 以不同溶剂为接受相时 HBAs 的富集因子*

Table 2 Enrichment factors of HBAs with different acceptor phases*

| Acceptor | α(Acceptor) / (mmol/L) | Enrichment factors | | | | | |
|-----------------------------------|------------------------|--------------------|----------|----------|-------|----------|----------|
| | | 3,4,5-THBA | 3,5-DHBA | 3,4-DHBA | 4-HBA | 2,5-DHBA | 2,4-DHBA |
| NaOH | 0.5 | 3.4 | 3.5 | 7.8 | 11.2 | 12.7 | 16.8 |
| | 1 | 3.5 | 3.9 | 7.9 | 12.0 | 13.6 | 19.2 |
| | 5 | 3.7 | 3.8 | 8.2 | 12.4 | 14.7 | 20.3 |
| | 10 | 4.7 | 6.3 | 10.3 | 15.8 | 23.9 | 27.0 |
| | 20 | 4.4 | 4.7 | 9.2 | 14.9 | 18.3 | 23.2 |
| NH ₃ ·H ₂ O | 0.5 | 5.4 | 5.9 | 12.3 | 18.3 | 18.2 | 30.2 |
| | 1 | 5.6 | 6.5 | 12.6 | 18.9 | 18.9 | 30.9 |
| | 5 | 5.9 | 6.8 | 13.1 | 19.5 | 19.2 | 31.5 |
| | 10 | 6.9 | 9.2 | 15.1 | 22.1 | 27.9 | 44.1 |
| | 20 | 8.6 | 14.1 | 19.7 | 28.8 | 39.1 | 56.7 |
| | 50 | 11.1 | 22.2 | 25.1 | 40.2 | 57.9 | 76.8 |
| | 80 | 14.2 | 26.9 | 30.2 | 51.9 | 89.5 | 103.3 |
| 90 | 10.3 | 2.3 | 29.2 | 49.5 | 70.9 | 85.5 | |

* C_{d,i} = 5 mg/L.

2.1.4 给体组成对萃取效率的影响

对于酸性的 HBAs,在给体中加入适量的酸有利于它们以分子状态存在,增加其在有机相中的溶解度而提高萃取效率。本实验考察了 HCl、H₂SO₄ 和 HAc 浓度分别为 0.1 ~ 100 mmol/L 时的萃取效率,结果见表 3。由表 3 可知,酸的种类和浓度对

HBAs 的 EF 影响较大,原因在于 6 种 HBAs 的 pK_a 值^[14]不同,使它们完全呈分子状态所需的 H⁺ 浓度不同。此外,HCl 用于调节给体的 pH 较 H₂SO₄ 和 HAc 的效果好。当 HCl 的浓度为 5 mmol/L 时 HBAs 的 EF 最大,故本文选择在给体中加入 5 mmol/L HCl。

表 3 给体中酸的种类及浓度不同时 HBAs 的富集因子*

Table 3 Enrichment factors of HBAs with different acids and concentrations in the donor phase*

| Acid | α(Acid) / (mmol/L) | Enrichment factors | | | | | |
|------|--------------------|--------------------|----------|----------|-------|----------|----------|
| | | 3,4,5-THBA | 3,5-DHBA | 3,4-DHBA | 4-HBA | 2,5-DHBA | 2,4-DHBA |
| HCl | 0.1 | 8.2 | 21.7 | 23.0 | 64.4 | 48.8 | 81.0 |
| | 1 | 9.0 | 21.9 | 21.7 | 50.3 | 74.6 | 94.6 |
| | 5 | 14.2 | 27.8 | 31.1 | 52.5 | 90.5 | 105.4 |
| | 10 | 10.7 | 22.0 | 16.6 | 36.5 | 60.2 | 89.2 |
| | 100 | 10.0 | 19.8 | 14.3 | 29.1 | 59.1 | 81.4 |

表3 (续)
Table 3 (Continued)

| Acid | α (Acid) / (mmol/L) | Enrichment factors | | | | | |
|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|------------------|------------------|-------|------------------|------------------|
| | | 3 <i>A</i> -THBA | 3 <i>S</i> -DHBA | 3 <i>A</i> -DHBA | 4-HBA | 2 <i>S</i> -DHBA | 2 <i>A</i> -DHBA |
| H ₂ SO ₄ | 0.1 | 5.4 | 21.0 | 21.4 | 72.5 | 25.6 | 87.2 |
| | 1 | 8.1 | 21.6 | 17.4 | 45.6 | 51.3 | 95.3 |
| | 5 | 7.8 | 21.3 | 16.8 | 45.0 | 54.7 | 99.1 |
| | 10 | 8.7 | 22.4 | 16.3 | 42.2 | 60.2 | 97.1 |
| | 100 | 8.6 | 21.4 | 16.1 | 35.3 | 60.0 | 42.9 |
| HAc | 0.1 | 5.2 | 20.1 | 23.4 | 75.2 | 19.4 | 80.2 |
| | 1 | 6.6 | 19.8 | 21.0 | 62.0 | 20.8 | 75.2 |
| | 5 | 9.6 | 14.7 | 11.4 | 24.8 | 22.9 | 54.2 |
| | 10 | 6.1 | 10.9 | 7.0 | 14.8 | 24.1 | 41.6 |
| | 100 | 2.6 | 2.7 | 1.8 | 4.4 | 14.1 | 13.3 |

* $C_{d,i} = 5$ mg/L.

2.1.5 给体中盐浓度对萃取效率的影响

考察了给体中 NaCl 的质量浓度为 0, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125 和 150 g/L 时 HBAs 的萃取效率, 发现随着盐浓度的增加 HBAs 的 EF 均降低, 这可能是由于加入盐之后, 给体的黏度增大, 阻碍了 HBAs 从给体到有机相的扩散而降低了萃取效率, 因此本实验确定在给体中不加盐。

2.1.6 搅拌速度对萃取效率的影响

考察了搅拌速度为 300, 600, 900, 1 200, 1 500 和 1 800 r/min 时 HBAs 的萃取效率, 发现随着搅拌速度的增大, HBAs 的 EF 逐渐增大, 1 200 r/min 时达到最高; 搅拌速度继续增大, 吸附在中空纤维上的有机溶剂因剧烈的振动而掉落, EF 会降低, 故将搅拌速度确定为 1 200 r/min。

2.1.7 搅拌时间对萃取效率的影响

考察了萃取时间分别为 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50 和 60 min 时的萃取效率, 结果 HBAs 的 EF 随萃取时间的延长而增加, 35 min 时萃取基本达平衡, 因此本实验将萃取时间确定为 35 min。

2.2 方法学考察

2.2.1 工作曲线

分别准确吸取一定体积的对照品储备液混合并用双蒸水稀释, 配制质量浓度为 4.50×10^{-4} , 1.80×10^{-3} , 9.00×10^{-3} , 4.50×10^{-2} , 1.80×10^{-2} , 9.00×10^{-2} , 4.50×10^{-1} , 0.90 , 4.50 , 18.00 , 27.00 mg/L 的系列混合标准液, 按 1.4 节所述方法萃取后, 经 HPLC 分析, 用色谱峰面积 y 对分析物质量浓度 α (mg/L) 进行线性回归, 结果见表 4。

表4 HBAs 的线性范围、线性相关系数及检出限

Table 4 Linear ranges, correlation coefficients (r^2) and limits of detection (LODs) of the HBAs

| Analyte | Linear range/(mg/L) | Regression equation* | r^2 | LOD/(μ g/L) |
|------------------|-------------------------------|-----------------------|--------|------------------|
| 3 <i>A</i> -THBA | $4.50 \times 10^{-2} - 18.00$ | $y = 70133c - 893$ | 0.9994 | 9.00 |
| 3 <i>S</i> -DHBA | $9.00 \times 10^{-3} - 4.50$ | $y = 498286c - 1094$ | 0.9989 | 1.80 |
| 3 <i>A</i> -DHBA | $9.00 \times 10^{-2} - 9.00$ | $y = 455990c - 2519$ | 0.9991 | 30.00 |
| 4-HBA | $4.50 \times 10^{-4} - 4.50$ | $y = 3201019c + 2057$ | 0.9994 | 0.09 |
| 2 <i>S</i> -DHBA | $4.50 \times 10^{-2} - 18.00$ | $y = 2309000c - 1098$ | 0.9993 | 15.00 |
| 2 <i>A</i> -DHBA | $9.00 \times 10^{-3} - 9.00$ | $y = 2337663c - 2171$ | 0.9996 | 1.80 |

* y : peak area; c : mass concentration, mg/L.

2.2.2 精密度

分别准确吸取一定体积的对照品储备液混合并用双蒸水稀释, 使混合标准液中 3 *A*-THBA、3 *S*-DHBA、3 *A*-DHBA、4-HBA、2 *S*-DHBA 和 2 *A*-DHBA 质量浓度分别为 0.90, 1.80×10^{-2} , 1.35 , 9.00×10^{-2} , 0.90 和 1.80×10^{-2} mg/L, 按 1.4 节所述方法萃取后, 经 HPLC 分析, 测定值的相对标准偏差 (RSD, $n = 5$) 分别为 0.7%, 1.2%, 0.4%, 2.8%, 1.7% 和 2.4%。

2.2.3 回收率

精密称取已知 HBAs 含量的柿蒂粉末(过 60 目筛) 0.75 g, 加入混合标准液及适量的水, 使总体积

为 100 mL, 回流 30 min, 用水补足减失的体积后摇匀, 过滤, 取续滤液按 1.4 节方法萃取, 经 HPLC 分析, 计算 HBAs 的加标回收率($n = 5$) 结果见表 5。

2.2.4 样品测定

精密称取柿蒂粉末(过 60 目筛) 1.5 g, 加水 100 mL, 回流 30 min, 用水补足减失的重量后摇匀, 过滤, 取续滤液按 1.4 节方法萃取及 HPLC 分析($n = 3$), 测得柿蒂中 3 *A*-THBA, 3 *A*-DHBA, 4-HBA, 2 *S*-DHBA 的含量分别为 0.256, 0.066, 0.020 和 0.019 mg/g, RSD 分别为 7.4%, 3.2%, 3.0% 和 3.4%。由图 3 可见经 3p-HFLPME 富集后样品得到了较好的净化, HBAs 的 EF 较高。

表 5 柿蒂中 HBAs 的回收率 (n = 5)

Table 5 Recoveries of HBAs in *Calyx Kaki* (n = 5)

| Analyte | Background/(mg/g) | Spiked/(mg/g) | Found/(mg/g) | Recovery/% | RSD/% |
|------------|---------------------|-----------------|----------------|------------|-------|
| 3 4 5-THBA | 0.193 | 0.210 | 0.396 | 96.7 | 4.2 |
| 3 5-DHBA | - | 0.030 | 0.028 | 93.3 | 4.9 |
| 3 4-DHBA | 0.049 | 0.070 | 0.115 | 94.3 | 5.7 |
| 4-HBA | 0.014 | 0.014 | 0.029 | 107.1 | 5.1 |
| 2 5-DHBA | 0.014 | 0.040 | 0.052 | 95.0 | 3.7 |
| 2 4-DHBA | - | 0.020 | 0.019 | 95.0 | 6.7 |

- : not detected.

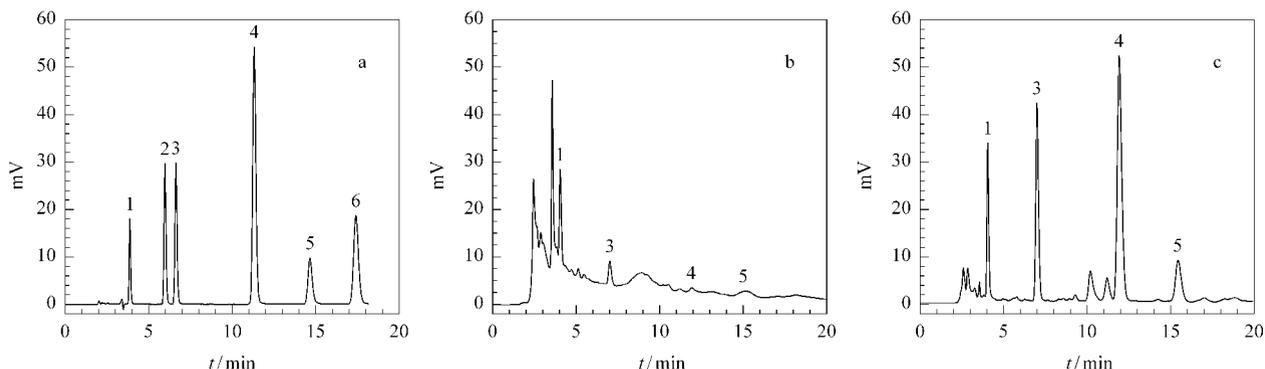


图 3 3p-HFLPME 对柿蒂样品的净化和对 HBAs 的富集作用

Fig. 3 Sample clean-up and enrichment of HBAs in *Calyx Kaki* by 3p-HFLPME

a. mixed standard solution (20.00 mg/L); b. *Calyx Kaki* sample without enrichment by 3p-HFLPME; c. *Calyx Kaki* sample enriched by 3p-HFLPME under the optimal conditions.

Peaks : 1. 3 4 5-THBA ; 2. 3 5-DHBA ; 3. 3 4-DHBA ; 4. 4-HBA ; 5. 2 5-DHBA ; 6. 4-DHBA.

2.3 HBAs 的 EF 与其理化、结构参数的相关关系

3p-HFLPME 富集 HBAs 的 EF 计算公式为 $EF = C_a / C_{d,i}$, 其中 $C_{d,i}$ 为 HBAs 在给体中的初始浓度, C_a 是 HBAs 经 3p-HFLPME 富集后在接受相中的浓度。HBAs 的理化、结构参数和在本实验优化的 3p-HFLPME 条件下的 EF 见表 6, EF 与各参数的关系见表 7。

由表 7 可知 (1) 3p-HFLPME 富集 HBAs 的 EF 与 $\log P_{n\text{-heptanol}/5 \text{ mmol/L HCl}}$ 呈良好的相关性, 而与

$\log P_{n\text{-heptanol}/\text{water}}$ 不相关。这主要是因为 HBAs 中含 -COOH 和 -OH 基团, 显酸性, 当给体中加入一定浓度的酸时, 改善了 HBAs 从给体到有机相的分配而有利于该类化合物扩散到正庚醇中, 使 EF 与 $\log P_{n\text{-heptanol}/5 \text{ mmol/L HCl}}$ 呈较好的相关性。(2) 3 4 5-THBA, 3 5-DHBA, 3 4-DHBA, 4-HBA 的 EF 与其 pK_a 呈线性正相关, pK_a 越大, 化合物的酸性越弱, 在同样的 pH 条件下, 化合物的分子化能力越强, 越有利于被有机相萃取, EF 越大。(3) 3 4 5-THBA、

表 6 HBAs 的理化、结构参数和优化 3p-HFLPME 条件下的富集因子

Table 6 Physico-chemical and structural parameters of HBAs and its EF under the optimal 3p-HFLPME conditions

| Parameter | 3 4 5-THBA | 3 5-DHBA | 3 4-DHBA | 4-HBA | 2 5-DHBA | 2 4-DHBA |
|---|------------|----------|----------|-------|----------|----------|
| EF | 14.9 | 28.2 | 31.9 | 53.7 | 91.2 | 107.6 |
| $\log P_{n\text{-heptanol}/5 \text{ mmol/L HCl}}^*$ | 0.77 | 1.17 | 0.85 | 1.34 | 1.86 | 2.17 |
| $\log P_{n\text{-heptanol}/\text{water}}^*$ | 0.22 | 0.58 | 0.67 | 1.19 | 0.11 | 0.86 |
| Number of -OH (N) | 3 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| $pK_a^{[14]}$ | 3.13 | 4.04 | 4.26 | 4.54 | 2.951 | 3.11 |

* $\log P_{n\text{-heptanol}/5 \text{ mmol/L HCl}}$ means *n*-heptanol/water conditional distribution coefficient of HBAs. $\log P_{n\text{-heptanol}/\text{water}}$ means *n*-heptanol/water distribution coefficient of HBAs. Both of them were obtained by shake-flask method.

表 7 HBAs 的富集因子与其理化、结构参数的相关关系

Table 7 Correlativities between EF and physico-chemical and structural parameters of HBAs

| Correlativities | Regression equation | r^2 |
|--|---|--------|
| EF and $\log P_{n\text{-heptanol}/5 \text{ mmol/L HCl}}$ | $EF = 65.3 \log P_{n\text{-heptanol}/5 \text{ mmol/L HCl}} - 34.22$ | 0.9531 |
| EF and $\log P_{n\text{-heptanol}/\text{water}}$ | $EF = 11.6 \log P_{n\text{-heptanol}/\text{water}} + 47.57$ | 0.0156 |
| EF and N (3 4 5-THBA, 3 5-DHBA, 4-HBA) | $EF = -19.4N + 71.07$ | 0.9681 |
| EF and N (3 4 5-THBA, 3 4-DHBA, 4-HBA) | $EF = -19.4N + 72.3$ | 0.9949 |
| EF and pK_a (3 4 5-THBA, 3 5-DHBA, 3 4-DHBA, 4-HBA) | $EF = 23.64 pK_a - 62.23$ | 0.8034 |

3,5-DHBA、3,4-DHBA、4-HBA 的 EF 与 N 呈线性负相关,HBAs 的 N 越大,EF 越小。(4)2,5-DHBA、2,4-DHBA 的 EF 与 N 和 pK_a 不相关,这可能是由于 2,5-DHBA、2,4-DHBA 中的 $-COOH$ 与 2 位的 $-OH$ 可形成分子内氢键,增加了这两种化合物分子的共平面性,大大降低了分子的极性,使其 $\log P_{n\text{-heptanol}/5\text{ mmol/L HCl}}$ 增大,进而改变了它们的 EF 与 N 和 pK_a 之间的相关性。

在没有分子内氢键形成时,HBAs 在优化 3p-HFLPME 条件下的 EF 主要取决于它们的 $\log P_{n\text{-heptanol}/5\text{ mmol/L HCl}}$ 、 pK_a 和 N ,因此可根据本实验研究的 6 种 HBAs 的 pK_a 和 N ,预测其他 HBAs 在相同 3p-HFLPME 条件下的 EF。

3 结论

本文通过对 6 种 HBAs 的 3p-HFLPME 行为的研究,初步探讨了 HBAs 的 3p-HFLPME 效率与中空纤维结构和有机溶剂种类的关系;揭示了 HBAs 富集因子与 HBAs 的理化性质和结构参数之间的关系,为构建 HBAs 的 3p-HFLPME 分离优化模型奠定了基础。此外,本文将 3p-HFLPME 用于中药柿蒂中 HBAs 的分析,3p-HFLPME 的富集倍数高、选择性好,可使样品得到充分净化,表明 HFLPME 有望用于采用常规前处理方法难以提取的微量或痕量中药活性成分的分离、纯化和浓缩,提高分析灵敏度、选择性和定性、定量分析速度。

参考文献:

- [1] Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K E. *Anal Chem*, 1999, 71 : 2 650
- [2] Vora-adisak N, Varanusupakul P. *J Chromatogr A*, 2006, 1 121 : 236
- [3] Jager L S, Andrews A R. *J Analyst*, 2001, 126 : 1 298
- [4] Zhu Y, Bai X H, Shen W J, et al. //Huang B L, et al. *Abstract Book of Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXV*. Xiamen : Xiamen University Press, 2007 : 332
- [5] Wang X Y, Chen X, Quan H, et al. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2008, 2(17) : 163
- [6] Wang X Y, Chen X, Bai X H. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (王晓园, 陈璇, 白小红. 分析化学), 2009, 37 (1) : 35
- [7] Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K E. *J Chromatogr A*, 2008, 1 184 : 132
- [8] Lin C Y, Huang S D. *J Chromatogr A*, 2008, 1 193 : 79
- [9] Rodriguez A, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K E, et al. *J Chromatogr A*, 2008, 1 198 : 38
- [10] Lu Z, Gong S L, Niu F L, et al. *Journal of Jilin University : Medicine Edition* (吕喆, 龚守良, 牛凤兰, 等. 吉林大学学报 : 医学版), 2008, 34(1) : 90
- [11] Wang C, Hu X W, Song X F. *China Journal of Chinese Materia Medica* (王初, 胡晓炜, 宋旭峰. 中国中药杂志), 2003, 28(5) : 463
- [12] Deng K J, Zhang Y, Wang P, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (邓科君, 张艺, 王平, 等. 色谱), 2006, 24(6) : 652
- [13] Zhang S R, Pei X P, Pei M R. *China Journal of Chinese Materia Medica* (张淑蓉, 裴香萍, 裴妙荣. 中国中药杂志), 2006, 31(7) : 602
- [14] ChemIDplus. [2009-02-15]. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>